

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520111153380

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

调控内源性大麻素系统对不同脑胶质瘤
细胞的影响研究

Effects of regulating endocannabinoid system in different
human glioma cells

巫慧娟

指导教师姓名: 邱彦副教授

专 业 名 称: 药理学

论文提交日期: 2014 年 4 月

论文答辩日期: 2014 年 5 月

学位授予日期 2014 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 4 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(邱 彦)课题(组)的研究成果,获得(邱 彦)课题(组)经费或实验室的资助,在(邱 彦)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

研究背景：脑胶质瘤是恶性度很高、易复发、预后差的颅内恶性肿瘤之一，在临床上一直是个难题。许多研究证明内源性大麻素具有抗肿瘤生成作用，包括抑制增殖、诱导凋亡和抑制迁移作用，但其对胶质瘤的作用靶点及详细机制尚未完全阐明。雷公藤红素可以抑制蛋白酶体活性、阻滞在细胞周期和诱导细胞凋亡，这使得它成为一种潜在的治疗胶质瘤的药物。

目的：本研究通过观察利用单独分子生物学、分子药理学手段调控内源性大麻素系统或与雷公藤红素联用后不同胶质瘤细胞的增殖情况，在细胞水平探讨胶质瘤可能的治疗靶点，为雷公藤红素开发成为抗胶质瘤新药提供依据。

方法：用细胞计数板计算细胞数绘制细胞的生长曲线，根据曲线计算出倍增时间；用 Western blot 方法检测细胞内 CD133 表达；内源性大麻素、游离脂肪酸及神经酰胺采用 LC-MS/MS 方法检测；使用荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术检测大麻素受体 CB1、CB2，大麻素水解酶 FAAH、MGL 等的基因 mRNA 表达水平及雷公藤红素对其的影响；用 CCK-8 试剂盒检测单独调控内源性大麻素系统或与雷公藤红素联用后胶质瘤细胞增殖的影响。

结果：SHG 细胞增长速度最快，具有干细胞特征。四种细胞内 FFAs、Ceramides 含量均有显著性差异。内源性大麻素系统中大麻素 AEA、2-AG 及其水解酶 FAAH、MGL，以及 CB1 的表达有显著性差异，2-AG 和 MGL 是调控内源性大麻素系统的重要靶点。雷公藤红素对胶质瘤细胞具有一定程度的抑制作用，存在时间和剂量依赖性，在此过程中上调了大麻素受体的基因表达，CB2 的升高更为明显，雷公藤红素与 2-AG 分解酶抑制剂 JZL184、小剂量的大麻素受体激动剂都可以增强的抗胶质瘤作用，可以作为抗胶质瘤作用的联合用药开发。

结论：上调内源性大麻素 2-AG 含量或激活相关信号通道会抑制胶质瘤细胞的增殖，内源性大麻素系统是治疗胶质瘤的有效靶点，雷公藤红素作为抗胶质瘤联合用药开发具有良好的临床应用前景。

关键词：内源性大麻素系统；胶质瘤细胞；雷公藤红素

Abstract

Background: Gliomas are high degree of recurrence, poor prognosis of malignant brain tumor, has been a difficult problem in clinical. Many studies have shown that endocannabinoids have anti-tumor effects, including inhibition of proliferation, induction of apoptosis and inhibition of migration, but its role and mechanism on glioma has not been fully elucidated. Celastrol can inhibit proteasome activity, arrest cell cycle and induce apoptosis, which makes it a potential drug to treat glioma.

Objective: Observe cell proliferation change after regulating the endocannabinoid system with or without celastrol, explore the possible glioma therapeutic targets at the cellular level. Try to make celastrol a new drug to resist glioma.

Methods: Cell growth curve was determined by cell counting method to calculate the doubling time; detecting intracellular CD133 expression by Western blot; endocannabinoids, free fatty acids and ceramides were detected by LC-MS/MS method; using RT-qPCR technology to detect cannabinoid receptor CB1, CB2, cannabinoid hydrolase FAAH, MGL and other gene expression levels of mRNA with or without celastrol; using CCK-8 kit to detect glioma cell proliferation after regulating endocannabinoid system with or without celastrol.

Results: Doubling time, CD133, intracellular FFAs, ceramides content were significant differences. There are also significant differences between 2-AG, FAAH, MGL, CB1. Celastrol inhibited glioma cells proliferation in time and dose dependent manner, up regulated mRNA of CBRs in the process, endocannabinoids enzyme inhibitors JZL184 and cannabinoid receptor agonists WIN55, 212-2 can enhance anti-glioma effect of celastrol. On the other hand, Celastrol can enhance the anti-tumor effect of JZL184.

Conclusion: The increase in endocannabinoid levels or activating the channel signaling inhibits proliferation of glioma cells, the endocannabinoid system is an effective target for the treatment of glioma, and celastrol can be a good drug combination.

Keywords: endocannabinoid system; glioma cells; celastrol

目 录

| | |
|---|----|
| 摘 要..... | I |
| Abstract..... | II |
| 第一章 前言 | 1 |
| 1.1 胶质瘤概述 | 1 |
| 1.1.1 胶质瘤简介 | 1 |
| 1.1.2 胶质瘤治疗手段 | 1 |
| 1.1.3 胶质瘤细胞系概况 | 2 |
| 1.2 内源性大麻素系统概述 | 3 |
| 1.2.1 内源性大麻素简介 | 3 |
| 1.2.2 内源性大麻素降解途径 | 5 |
| 1.2.3 内源性大麻素系统与肿瘤 | 7 |
| 1.3 雷公藤红素概述 | 10 |
| 1.3.1 雷公藤红素简介 | 10 |
| 1.3.2 雷公藤与脑胶质瘤 | 10 |
| 1.4 液相色谱-二级质谱联用分析技术 | 11 |
| 1.5 立题依据 | 11 |
| 参 考 文 献 | 12 |
| 第二章 四种人脑胶质瘤细胞系的比较研究 | 18 |
| 2.1 四种脑胶质瘤细胞系的生长曲线比较 | 18 |
| 2.1.1 仪器和试剂 | 18 |
| 2.1.2 实验方法 | 19 |
| 2.1.3 实验结果和讨论 | 20 |
| 2.2 四种脑胶质瘤细胞系的 CD133 表达差异比较 | 21 |
| 2.2.1 仪器和试剂 | 21 |
| 2.2.2 实验方法 | 24 |
| 2.2.3 实验结果和讨论 | 26 |
| 2.3 四种脑胶质瘤细胞系的游离脂肪酸（FFAs）与神经酰胺（CRE）表达差异比较 | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.1 仪器和试剂..... | 27 |
| 2.3.2 实验方法..... | 27 |
| 2.3.3 实验结果和讨论..... | 28 |
| 2.4 本章小结 | 30 |
| 参 考 文 献 | 31 |
| 第三章 内源性大麻素系统在四种人脑胶质瘤细胞系中的表达规律研究..... | 32 |
| 3.1 内源性大麻素水平在四种脑胶质瘤细胞系中的比较 | 32 |
| 3.1.1 仪器和试剂..... | 32 |
| 3.1.2 实验方法..... | 33 |
| 3.1.3 实验结果和讨论..... | 34 |
| 3.2 大麻素受体和分解酶在四种脑胶质瘤细胞系中的比较 | 36 |
| 3.2.1 仪器和试剂..... | 36 |
| 3.2.2 实验方法..... | 36 |
| 3.2.3 实验结果和讨论..... | 39 |
| 3.3 本章小结 | 42 |
| 参 考 文 献 | 43 |
| 第四章 雷公藤红素对人脑胶质瘤细胞及其内源性大麻素系统的影响 | 45 |
| 4.1 雷公藤红素对人脑胶质瘤细胞增殖的影响 | 45 |
| 4.1.1 仪器和试剂..... | 45 |
| 4.1.2 实验方法..... | 46 |
| 4.1.3 实验结果和讨论..... | 47 |
| 4.2 雷公藤红素对人脑胶质瘤细胞中大麻素受体的影响 | 49 |
| 4.2.1 仪器和试剂..... | 49 |
| 4.2.2 实验方法..... | 49 |
| 4.2.3 实验结果和讨论..... | 52 |
| 4.3 雷公藤红素对人脑胶质瘤细胞中内源性大麻素及神经酰胺水平的影响...53 | |
| 4.3.1 仪器和试剂..... | 53 |
| 4.3.2 实验方法..... | 54 |
| 4.3.3 实验结果和讨论..... | 55 |
| 4.4 本章小结 | 57 |

| | |
|---|----|
| 参 考 文 献 | 57 |
| 第五章 雷公藤红素协同调控内源性大麻素系统对人脑胶质瘤细胞的影响..... | 58 |
| 5.1 仪器和试剂 | 58 |
| 5.2 实验方法 | 59 |
| 5.2.1 细胞培养..... | 59 |
| 5.2.2 细胞毒性实验..... | 59 |
| 5.3 实验结果和讨论 | 59 |
| 5.3.1 内源性大麻素分解酶抑制剂 JZL184 单独及与雷公藤红素联用对四种脑胶质瘤细胞增殖的影响..... | 59 |
| 5.3.2 大麻素受体拮抗剂 AM251、SR141716、SR144528 单独及与雷公藤红素联用对四种脑胶质瘤细胞增殖的影响..... | 61 |
| 5.3.3 辣椒素受体拮抗剂 Capsazepine 单独及与雷公藤红素联用对四种脑胶质瘤细胞增殖的影响..... | 63 |
| 5.3.4 大麻素受体激动剂 WIN 55,212-2 单独及与雷公藤红素联用对四种脑胶质瘤细胞增殖的影响..... | 64 |
| 5.3.5 大麻素受体激动剂与拮抗剂联用对四种脑胶质瘤细胞增殖的影响..... | 66 |
| 5.4 本章小结 | 67 |
| 参 考 文 献 | 67 |
| 第六章 结论 | 68 |
| 缩 略 语 表 | 69 |
| 致 谢..... | 70 |
| 附 录..... | 71 |

Table of Contents

| | |
|--|-----------|
| Abstract in Chinese..... | I |
| Abstract in English | II |
| Chapter 1 Introduction..... | 1 |
| 1.1 Glioma | 1 |
| 1.1.1 About glioma | 1 |
| 1.1.2 Glioma treatment | 1 |
| 1.1.3 Glioma cell lines | 2 |
| 1.2 Endocannabinoid system | 3 |
| 1.2.1 About Endocannabinoid..... | 3 |
| 1.2.2 Degradation pathway of Endocannabinoid..... | 5 |
| 1.2.3 Endocannabinoid system and cancer | 7 |
| 1.3 Celastrol..... | 10 |
| 1.3.1 About Celastrol | 10 |
| 1.3.2 Celastrol and glioma | 10 |
| 1.4 LC-MS/MS | 11 |
| 1.5 Foundation | 11 |
| Reference | 12 |
| Chapter 2 A comparative study of four human glioma cell lines | 18 |
| 2.1 Comparison of the growth curve..... | 18 |
| 2.1.1 Instruments and reagents..... | 18 |
| 2.1.2 Experimental Methods | 19 |
| 2.1.3 Results and Discussion | 20 |
| 2.2 Comparison of CD133..... | 21 |
| 2.2.1 Instruments and reagents..... | 21 |
| 2.2.2 Experimental Methods | 23 |
| 2.2.3 Results and Discussion | 26 |
| 2.3 Comparison of Free fatty acids (FFAs) and Ceramide (CRE) | 27 |
| 2.3.1 Instruments and reagents..... | 27 |
| 2.3.2 Experimental Methods | 27 |
| 2.3.3 Results and Discussion | 28 |
| 2.4 Conclusion..... | 30 |
| Reference | 31 |

| | |
|---|-----------|
| Chapter 3 Expression of Endocannabinoid system in four human glioma cell lines | 32 |
| 3.1 Comparison of Endocannabinoid levels | 32 |
| 3.1.1 Instruments and reagents..... | 32 |
| 3.1.2 Experimental Methods | 33 |
| 3.1.3 Results and Discussion | 34 |
| 3.2 Comparison of Endocannabinoid receptors and enzymes..... | 36 |
| 3.2.1 Instruments and reagents..... | 36 |
| 3.2.2 Experimental Methods | 37 |
| 3.2.3 Results and Discussion | 39 |
| 3.3 Conclusion | 43 |
| Reference | 43 |
| Chapter 4 Effect of Celastrol on glioma cells and its endocannabinoid system | 45 |
| 4.1 Effect of Celastrol on proliferation of glioma cells..... | 45 |
| 4.1.1 Instruments and reagents..... | 45 |
| 4.1.2 Experimental Methods | 46 |
| 4.1.3 Results and Discussion | 47 |
| 4.2 Effect of Celastrol on endocannabinoid receptors in glioma cells | 49 |
| 4.2.1 Instruments and reagents..... | 49 |
| 4.2.2 Experimental Methods | 49 |
| 4.2.3 Results and Discussion | 52 |
| 4.3 Effect of Celastrol on endocannabinoids and ceramide in glioma cells | 53 |
| 4.3.1 Instruments and reagents..... | 53 |
| 4.3.2 Experimental Methods | 54 |
| 4.3.3 Results and Discussion | 55 |
| 4.4 Conclusion | 57 |
| Reference | 57 |
| Chapter 5 Effect of regulating endocannabinoid system with or without celastrol in glioma cells..... | 58 |
| 5.1 Instruments and reagents | 58 |
| 5.2 Experimental Methods..... | 59 |
| 5.2.1 Cell culture..... | 59 |
| 5.2.2 Cytotoxicity assay..... | 59 |
| 5.3 Results and Discussion | 59 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3.1 Effect of JZL184 with or without celestrol on cell viability in glioma cells | 59 |
| 5.3.2 Effect of AM251、SR141716、SR144528 with or without celestrol on cell viability in glioma cells | 61 |
| 5.3.3 Effect of Capsazepine with or without celestrol on cell viability in glioma cells | 63 |
| 5.3.4 Effect of WIN 55,212-2 with or without celestrol on cell viability in glioma cells | 64 |
| 5.3.5 Effect of WIN 55212-2 with or without SR141716 & SR144528 on cell viability in glioma cell lines | 66 |
| 5.5 Conclusion | 67 |
| Reference | 67 |
| Chaper 6 Conclusion | 68 |
| Abbreviations | 69 |
| Acknowledgements | 70 |
| Appendix | 71 |

第一章 前言

1.1 胶质瘤概述

1.1.1 胶质瘤简介

神经胶质瘤，简称胶质瘤，是在脑部或脊椎原发的肿瘤。它被称为神经胶质瘤是因为它源于神经胶质细胞，胶质瘤最常发生的部位是大脑^[1]。它占所有的大脑和中枢神经系统肿瘤的比例约 30%~40%， 占有所有恶性脑肿瘤的比例约为 80%^[2]。

胶质瘤按照肿瘤的细胞形态、恶性程度和发生部位进行分类。按细胞形态分类，胶质瘤根据具有共同组织学特性的细胞形态来命名，并不表明一定来源于这类细胞，主要分为：室管膜瘤、星形胶质细胞瘤、少突胶质瘤细胞瘤、脑干胶质瘤、视神经胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤等。世界卫生组织按照胶质瘤的多形性、核分裂象多见、血管内皮增生、组织坏死四个特性具备的多寡，将胶质瘤分为 I ~IV 四个等级^[3]， I 级的胶质瘤没有上述任何一个特征， II 级胶质瘤具有上述的其中一个特征， III 级胶质瘤具有上述的其中两个特征， IV 级胶质瘤具有上述的其中两个以上的特征，其中 I 级和 II 级被定义为低级别， III 级和 IV 级被定义为高级别^[3]。

胶质瘤治愈率很低，高级别胶质瘤患者的预后普遍较差，尤其是对老年患者而言。每年诊断出患有恶性神经胶质瘤的患者中，一年后的存活率大约为 50%，两年后约为 25%，间变性星形细胞瘤患者能生存三年左右，胶质母细胞瘤的预后更差，确诊后的平均存活率小于 12 个月，尽管随着治疗方法的改进，这已延长至 14 个月^[4]。脑胶质瘤的侵袭性非常强，肿瘤细胞呈浸润性生长，与正常的脑部组织没有非常明显的界限，且大多数肿瘤都不仅仅生长于一个脑叶，而是向脑组织内部呈指状深入性生长，同时伴随着大量的新血管生成，这些都是导致脑胶质瘤极其容易复发的原因^[5]。对胶质瘤采取新的治疗策略迫在眉睫。

1.1.2 胶质瘤治疗手段

治疗脑胶质瘤依赖于肿瘤所在的位置，细胞类型及其恶性程度。通常，对胶质瘤的治疗是一个组合型的方案，同时使用外科手术、放射疗法和化疗。放射疗

法是指体外放射形式，或放射外科的立体定向方法。脊髓肿瘤可以通过手术和放射疗法来治疗。

替莫唑胺是一种化疗药物，能够有效地穿过血脑屏障，目前在高级别的胶质瘤治疗中使用。对于极其容易复发的高级别胶质瘤，最近的研究利用血管生成抑制剂（如贝伐单抗）与常规化疗相结合，结果令人鼓舞^[6]。2007 年的一项荟萃分析比较了手术切除和活检作为初始手术治疗选项的情况，结果表明，没有足够的证据做出可靠的决策。

对于高级别胶质瘤而言，2003 年的荟萃分析比较了单独放疗与放化疗结合疗法的情况，结果显示使用化疗与放疗结合的方法对患者有轻微但是明确的改善^[7]。在低级别胶质瘤的比较研究中发现，以早期手术切除为中心的治疗方案比以活组织检查和观察等待为中心的治疗方案的整体存活率更高^[8]。对于胶质母细胞瘤而言，2008 年的荟萃分析表明，替莫唑胺在“延长生存期，延缓肿瘤进展为主要部分的治疗方案，而不会影响正常生活质量，并且早期不良事件的发生率较低”方面是一种有效的治疗方案^[9]。

1.1.3 胶质瘤细胞系概况

胶质瘤细胞系的建立一般采用 Tetsuo Kanno 的方法，用 Egael MEM 培养液作单层静止培养，细胞贴壁生长，每 7-10 天传代 1 次^[10]，如 SHG44 细胞就是采用这种方法，1979 年取材于 32 岁、女性额叶星形细胞瘤 II-III 级的病人。动物异种移植成功，LDH 同工酶测定显示了恶性肿瘤的特征，光镜和电镜分别见到胶质纤维和微丝。生化和组化技术检出了神经组织特有的 S-100 蛋白和胶质细胞特有的 GFA 蛋白，因此可以确认该细胞是人脑恶性胶质瘤细胞，排除了其它细胞的可能性，为今后人脑恶性胶质瘤的研究提供了一个有用的工具^[11]。

BT325 细胞的建立方法略有不同，取手术切除的新鲜瘤组织，记录患者基本情况和肿瘤分级，在无菌条件下将瘤组织切成小块种入玻瓶中，2 小时后加入含 20% 灭活的小牛血清及适量青霉素的 1640 培养基，37℃ 培养箱中培育 3 天，从组织块边上分离出大量细长突起的星形细胞，一个月后细胞长满瓶壁即用，每 7 天用 0.25% 的胰蛋白酶传代一次。透射电镜观察细胞形态呈多样化，并且可以看见多量微管及束状微丝，移植至裸鼠皮下，待生长成肿瘤后，病理切片 HE、PTAH 及 Foot's 染色，结果证实其确实为恶性胶质瘤。免疫化学染色胶质细胞特有的胶

质纤维酸性蛋白（GFAP）也呈阳性反应。

A172 和 U251 是 Giard 等^[12]在 1973 年取 200 例人的肿瘤组织体外培养时建立的细胞系。依赖于建立体外种植和胰蛋白酶消化技术，13 种肿瘤细胞系建立，包括肉瘤，黑色素瘤，脑肿瘤等。所有这些细胞系，在培养 1 年后表现出显著的多层化，交错化，形态上与从人成纤维细胞或上皮细胞的正常接触抑制不同。它们在正常细胞的单细胞层上也能形成群落，在软琼脂中增长效率很高^[12]。

1.2 内源性大麻素系统概述

植物大麻（*Cannabis sativa*），荨麻目桑科大麻亚科的草本植物，或称白麻、线麻、山丝苗，特指雌性植物经干燥的花和毛状体。大麻（*Marijuana*）是指以草药的形式制成的大麻，包括成熟的雌株花、叶及茎，大麻作为药物使用已经有几千年的历史，但也是当今西方社会中被滥用最多的成瘾性药物。其主要活性成分以 Δ^9 -四氢大麻酚（*deltatetrahydrocannabinol*, Δ^9 -THC）为主。虽然大麻具有催眠、促进食欲、影响短暂记忆及认知、治疗肿瘤等作用^[13]，但由于机制不明，加上大麻明显的精神兴奋性及成瘾性，使其在临床上的应用受到很大程度的限制。直到上世纪九十年代，科学家才发现 THC 促进食欲及抗肿瘤的作用靶点为大麻素受体 I 型（*cannabinoid receptor 1*, CB1），随后其亚型大麻素受体 II 型（*cannabinoid receptor 2*, CB2）也被发现并被克隆^[14]。

1.2.1 内源性大麻素简介

除天然存在的大麻素外，上世纪九十年代初期，Devane 等发现人体内合成和分泌的一部分小分子脂类化合物也能作用于大麻素受体，发挥与大麻相类似的生理作用，故将其称为内源性大麻素（*endocannabinoids*）^[13]。这些脂类小分子中，以花生四烯酸乙醇胺（*anandamide*, AEA）及 2-花生四烯酸甘油酯（*2-arachidonylglycerol*, 2-AG）作用最为明显^[15]，它们的结构与 THC 较为相似，可与体内的大麻素受体相结合，产生一系列生理药理效应。大麻素受体，内源性大麻素及其合成、转运、代谢的蛋白共同构成了一个对疼痛、炎症、免疫、情感、肿瘤有着广泛调节作用的内源性大麻素系统^[16]。内源性大麻素系统已被诸多研究证明在人体许多方面都具有重要的生理作用，例如情绪调节、疼痛调节、神经系统保护、能量代谢、肿瘤形成及发展等等^[16]。

内源性大麻素种类繁多，均为花生四烯酸的衍生物，迄今已鉴别出 5 种，分别是：N-花生四烯酰乙醇胺（anandamide, AEA）^[17]、2-花生四烯酰甘油酯（2-arachidonoylglycerol, 2-AG）、2-花生四烯酰甘油乙醚酯（2-Arachidonylethanol ether, 2-AGE）、花生四烯酰多巴胺（N-Arachidonoyldopamine, NADA）和 O-花生四烯酰乙醇胺（O-arachidonyl ethanolamine, OAE）。其中 AEA 和 2-AG 是被研究的最深入的两种内源性大麻素。除此之外，还有一些脂类分子例如：油酰乙醇胺（N-Oleoyl ethanolamide, OEA）^[18]、棕榈酰乙醇胺（N-Palmitoyl ethanolamide, PEA）^[19]，它们虽不与大麻素受体相结合，但是由于其与内源性大麻素有着相似的结构以及在内分泌调节方面类似的功能，也被归类于内源性大麻素。与传统的神经递质或荷尔蒙由细胞内的分泌囊泡分泌不同，内源性在体内并不蓄积，而是当细胞膜接受外界刺激，“按需”在局部合成并释放，并能被相应的大麻素转运蛋白迅速重摄取至细胞内，由特异性的代谢酶水解成脂肪酸。THC、AEA、2-AG 的化学结构如图 1.1 所示。

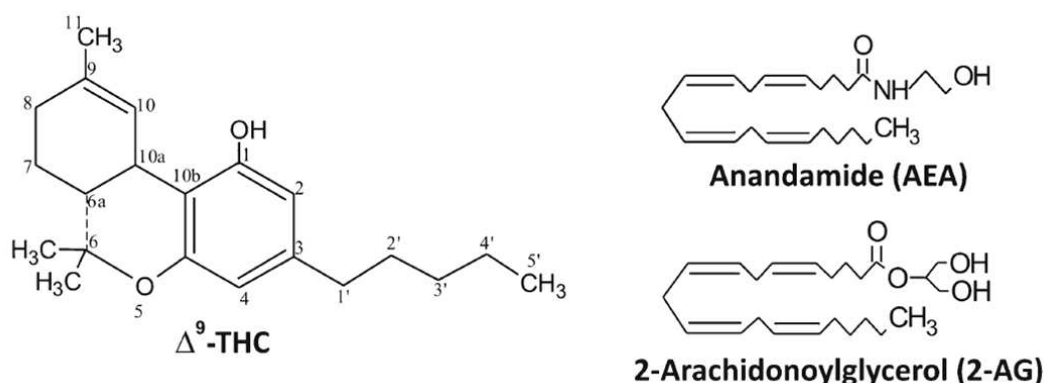


图 1.1 大麻有效成分 THC 及内源性大麻素 AEA、2-AG 的化学结构

Fig 1.1 The chemical structure of THC, AEA, 2-AG

人体中被发现存在以下两种大麻素受体：CB1（Cannabinoid Receptor 1）和 CB2（Cannabinoid Receptor 2）。CB1 受体主要分布于中枢神经系统，是大麻类物质能够产生神经效应的基础，在外周脏器中也有少量的表达；CB2 受体主要存在于免疫系统和胃肠道中，脾脏中含量最高^[20]。CB1 受体和 CB2 受体同属 G 蛋白偶联受体（G-Protein Coupled Receptor, GPCR），分别由 CNR1 和 CNR2 基因编码，二者的氨基酸序列有 44% 的同源性^[20]，跨膜区的同源性更高达 68%^[21]。大麻素受体通过受体偶联的 G 蛋白介导，使第二信使物质增多或减少，转而改

变膜上的离子通道,引起膜电位发生变化。当激活 CB 受体时,会使 cAMP 减少,蛋白激酶 A (PKA) 活性受到抑制,导致该酶靶蛋白(离子通道等)磷酸化受阻,抑制 Ca^{2+} 的释放,进而发挥其生理学作用^[22]。如激活 CB1 受体,具有神经保护、抑制疼痛、抑制食欲、抑制焦虑和恐惧、胃肠道保护、抑制消化道蠕动及止吐等作用^[23]。CB1 受体的拮抗剂及反向激动剂具有治疗肥胖、糖尿病、代谢紊乱综合症及戒毒等作用。其中第一个在临床上应用的 CB1 拮抗剂是 SR141716A (利莫那班)^[24],主要用于治疗肥胖。CB2 受体在炎症反应及免疫反应方面具有一定的作用。THC 刺激小鼠时,会产生 T 细胞激活反应。用 THC 刺激 CB2 敲除小鼠时,则没有了这一反应^[25]。1994 年, Sugiura 等发现在大鼠脑中的突触体内, 2-AG 对大麻素受体具有较强的亲和力^[26]。AEA 对 CB1 受体比对 CB2 具有更高的亲和力(解离常数, $K_i = 52 \text{ nM}$)^[27]。然而, 2-AG 对 CB1 和 CB2 都具有亲和力,但是对 CB2 的亲和力更大。

1.2.2 内源性大麻素降解途径

体内内源性大麻素 AEA 和 2-AG 主要是在神经细胞内进行一系列合成和降解等过程。神经细胞在外源性或生理性刺激下,神经细胞膜上的磷脂分解产生了 AEA 和 2-AG,之后经过不同的降解途径排出体外。

AEA 在载体的作用下转运到细胞内,然后被 FAAH 酶水解,生成花生四烯酸和乙醇胺(图 1.2),从而丧失了生理活性。FAAH 属于丝氨酸水解酶家族,主要表达于细胞膜上,在体内分布比较广泛,但主要在大脑和肝脏分布较多。通过抑制水解酶 FAAH 的活性能提高体内 AEA 的水平,从而发挥一定的生理及药理作用。目前对 FAAH 抑制剂的研究很多,URB597 为 FAAH 酶的不可逆抑制剂,提高 AEA 的水平,发挥镇痛、抗抑郁等作用^[28]。此外,只作用于外周系统的 FAAH 抑制剂 URB937 能显著提高肝脏等部位的 AEA 水平,在不影响中枢神经系统的功能的基础上具有广泛的镇痛作用^[29]。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库